



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

25 FEV. 2005

Fait à Paris, le _____

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Martine PLANCHE', is enclosed within a decorative oval border.

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



BREVET D'INVENTION

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cédex 08
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livreVI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: 1 juil. 2002 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: 0208212 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: 75 DATE DE DÉPÔT: 01 JUIL. 2002	Chantal PEAUCHELLE Cabinet ARMENGAUD AINE 3, Avenue Bugeaud 75116 PARIS France
Vos références pour ce dossier: CP/60.711-1540	

1 NATURE DE LA DEMANDE		
Demande de brevet		
2 TITRE DE L'INVENTION		
MOYENS DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DES VEGETAUX		
3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE	Pays ou organisation	Date
4-1 DEMANDEUR		
Nom	UNIVERSITE DE BOURGOGNE	
Rue	Maison de l'Université Esplanade Erasme B.P. 27877	
Code postal et ville	21078 DIJON CEDEX	
Pays	France	
Nationalité	France	
Forme juridique	Etablissement public	
N° de téléphone	03-80-39-69-69	
N° de télécopie	03-80-39-50-69	
Courrier électronique	www.u-bourgogne.fr	
5A MANDATAIRE		
Nom	PEAUCHELLE	
Prénom	Chantal	
Qualité	CPI: 92-1189	
Cabinet ou Société	Cabinet ARMENGAUD AINE	
Rue	3, Avenue Bugeaud	
Code postal et ville	75116 PARIS	
N° de téléphone	01-45-53-05-50	
N° de télécopie	01-45-53-80-21	
Courrier électronique	armengau@club-internet.fr	

6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS		Fichier électronique	Pages	Détails
Description		desc.pdf	9	
Revendications		V	2	13
Dessins			1	1 fig., 3 ex.
Abrégé		V	1	
Listage des séquences, PDF		60711.st25.pdf	V	
Rapport de recherche				
Chèque			1 doc.	0002490
Récépissé de dépôt. 1				CNCM I-2896
Récépissé de dépôt. 2				CNCM I-2897
Disquette séquence			1 doc.	
lettre accompagnatrice des séquences				
7 MODE DE PAIEMENT				
Mode de paiement	Remise d'un chèque			
Numéro de chèque	0002490			
Remboursement à effectuer sur le compte n°	036			
8 RAPPORT DE RECHERCHE				
Etablissement immédiat				
9 REDEVANCES JOINTES		Devise	Taux	Quantité
062 Dépôt		EURO	35.00	1.00
063 Rapport de recherche (R.R.)		EURO	320.00	1.00
068 Revendication à partir de la 11ème		EURO	15.00	3.00
Total à acquitter		EURO		400.00
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE				
Signé par	Chantal PEAUCELLE 			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Moyens de lutte biologique contre les maladies
cryptogamiques des végétaux

L'invention vise des moyens, à savoir des compositions et
5 des méthodes, de lutte biologique contre les maladies
cryptogamiques des végétaux, c'est-à-dire provoquées par des
champignons pathogènes.

La lutte biologique, c'est-à-dire l'utilisation de
microorganismes vivants pour combattre les maladies, des
10 plantes, suscite un grand intérêt compte tenu des problèmes
croissants posés par l'emploi des fongicides chimiques en
agriculture. Les nappes phréatiques polluées, les sols
contaminés, et la résistance des champignons pathogènes aux
fungicides sont en effet autant de défis à surmonter pour
15 l'agriculture moderne.

Dans le domaine viticole par exemple, il s'impose de
produire des vins de qualité toujours plus élevée et de
réduire les pollutions occasionnées par l'utilisation
intensive de produits chimiques.

20 Des bactéries, comme *Bacillus Thuringiensis*, ou des
champignons, comme *Beauveria* ou *Endothia*, ont déjà été
proposés comme moyens de lutte biologique.

Or des moyens de grande efficacité et dépourvus de
toxicité ont pu être développés par les inventeurs en
25 utilisant des microorganismes en mélange. De tels mélanges,

non seulement agissent en synergie dans la lutte biologique recherchée, mais exercent en outre, avec avantage, un effet éliciteur.

L'invention a donc pour but de fournir de nouvelles compositions de microorganismes et leur application comme moyens de lutte biologique contre les maladies cryptogamiques des végétaux, plus spécialement des plantes cultivées.

Les compositions de microorganismes de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles comprennent en mélange au moins une bactérie et au moins une levure, la ou les bactéries et la ou les levures étant non toxiques pour le végétal à traiter.

La ou les bactéries sont choisies dans les groupes *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* ou *Streptomyces*.

Il s'agit en particulier de bactérie(s) de l'espèce *Bacillus megaterium*, et tout spécialement de la souche déposée le 20 Juin 2002 à la CNCM, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, sous le N°I-2896.

La ou les levures des compositions de l'invention sont avantageusement du genre *Debaryomyces* ou *Pichia*. Il s'agit en particulier de la levure du genre *Debaryomyces* déposée le 20 Juin 2002 à la CNCM sous le N°I-2897.

Les souches de bactéries et de levures utilisées sont avantageusement sélectionnées à partir de microorganismes du sol ou prélevées sur le végétal à traiter. Elles ne perturbent donc pas l'équilibre biologique de l'écosystème puisqu'elles en sont issues.

Ces compositions permettent de traiter les principales maladies fongiques des végétaux et sont donc particulièrement appropriées pour élaborer des préparations biofungicides. Ces préparations sont caractérisées en ce qu'elles renferment une 5 quantité efficace d'au moins une composition telle que définie ci-dessus, en association avec un véhicule inerte. Le véhicule utilisé est notamment capable d'assurer une bonne dispersion et adhésion des microorganismes sur la partie aérienne de la plante.

10 Ces préparations présentent un large spectre d'efficacité face aux champignons pathogènes et sont avantageusement utilisées pour le traitement des maladies cryptogamiques des végétaux, notamment des plantes cultivées, par exemple vigne, tomate, fraise, blé, pomme de terre, tabac, canne à sucre, 15 maïs, riz, arbres fruitiers, betterave.

Elles sont ainsi appliquées par exemple au traitement de l'oïdium, du mildiou, et du *Botrytis* de la vigne, ainsi que des maladies du bois (esca ou eutypa).

20 Ces préparations présentent également l'avantage d'exercer un effet d'éliciteur qui se traduit par une activation des défenses naturelles de la plante contre les agresseurs d'origine fongique.

Les traitements sont effectués notamment par pulvérisation sur les parties aériennes avec des préparations 25 renfermant la ou les bactéries et la ou les levures, avec des quantités modulables selon la pression des pathogènes. Des

préparations appropriées renferment par exemple lesdites bactéries et levures dans un rapport d'environ 50/50%.

On notera que l'application de ces traitements ne nécessite aucun changement de matériel de la part de 5 l'utilisateur.

Selon une disposition supplémentaire de l'invention, le traitement est complété le cas échéant à l'aide d'une composition de champignons, plus spécialement de champignons filamenteux, en particulier du genre *Pythium*, *Trichoderma*, 10 *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Talaromyces*, *Epicoccum*.

Après l'application, les souches de la préparation ne restent que quelques jours sur la plante avant de mourir et de se dégrader. Leur présence dans le sol n'est pas supérieure à un taux normalement constaté et est nulle au-delà de trente 15 centimètres de profondeur.

Ces mélanges de microorganismes n'apportent donc aucune nouvelle forme de pollution.

L'invention vise également la mise à profit de l'effet éliciteur des mélanges de microorganismes de l'invention pour 20 produire des composés d'intérêt, comme le resvératrol, molécule présentant notamment un effet protecteur du système cardiaque, ou encore le ptérostilbène, en quantités plus élevées que celles produites par la vigne à la suite d'une élicitation telle que celle produite par *Botrytis*.

25 L'invention vise ainsi un procédé de production de resvératrol et/ou de ptérostilbène, comprenant l'application à un végétal, notamment la vigne, d'une composition de

microorganismes telle que définie plus haut, et la récupération du resvératrol et/ou de ptérostilbène par exemple par extraction.

Le resvératrol est utilisable pour la fabrication de 5 médicaments notamment à visée cardio-vasculaire, en cosmétologie ou comme nutricament. Le ptérostilbène est utilisable comme antifongique.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent donnés aux fins 10 d'illustration de l'invention et en se reportant à figure unique qui présente la production de resvératrol avec différentes combinaisons de bactéries et/ou levures et/ou champignons.

Exemple I : Isolement et culture de la souche de 15 bactéries BP B01 et de la levure BP Y01 :

L'isolement est réalisé comme suit :

Les deux microorganismes sont cultivés sur un milieu nutritif solide le PDA (Potato dextrose agar). Les deux 20 microorganismes sont ensemencés séparément dans des fermenteurs de 20 litres contenant du PDB (Potato dextrose broth). Les levures sont cultivées à 28°C et les bactéries à 37°C. Les microorganismes ainsi préparés sont centrifugés et le culot de bactéries et levures est récupéré séparément dans l'eau distillée stérile. Au moment du traitement du végétal, 25 les deux microorganismes sont mélangés. Le vignoble subit trois traitements par mois, d'avril à août, donc un total de 10 à 12 traitements par le mélange de l'invention pour la

saison. Le produit préparé par fermentation est utilisé pour toute la saison, chaque litre contenant de $0,5-0,75 \times 10^{10}$ pour les levures et $0,30-0,50 \times 10^{10}$ pour les bactéries, à raison de 1 litre par pied de vigne.

5 Caractérisation de l'ADN génomique de BP Y01

L'isolation de l'ADN génomique de BP Y01 et l'amplification de la zone ITS, entre les gènes 16S et 23S a été réalisée selon Chen, W. Schneider RW, et Hoy J.W. 1992, Phytopathology, 82, p 1234-1244. La séquence correspondante 10 SEQ ID N°1 a été déposée au GENBANK (N° d'accès AY 125961).

La levure BP Y01 a été isolée de baies de raisins provenant de différents vignobles de la région de Bourgogne.

L'ADN génomique de BP Y01 a été isolé et la zone ITS, entre les gènes 18S et 28S amplifiée selon les méthodes ci-dessus.

Le fragment ITS1 se trouve entre les gènes 18S et 5,8 S, tandis que ITS2 se trouve entre les gènes 5,8 S et 28 S. La séquence SEQ ID N°2 a été déposée au GENBANK (N° d'accès AY 125962).

20 Résultats de lutte biologique sur le cépage chardonnay en 1999 et 2000 au Centre Expérimental de Marsannay - La Côte, France (Université de Bourgogne)

	Année : 1999	Résultats
25	Nombre de pieds témoins non traités	450 10
	Nombre de traitements	15
	Type d'inoculum	Bactéries + Levures
	Protection	39 pieds malades (Mildiou), <i>O. Botrytis</i>
30	Témoins	Mildiou puis <i>Botrytis</i> sur tous les pieds, intervention chimique

	Année : 2000	Résultats
5	Nombre de pieds	241
	Nombre de traitements	14
	Type d'inoculum	Bactéries + Levures
	Protection	27 pieds malades (Mildiou), <i>O Botrytis</i>
	Témoins	Mildiou puis <i>Botrytis</i> sur tous les pieds

10

Résultats de lutte biologique sur le cépage pinot-noir en 2000 et 2001 au Centre Expérimental de Marsannay - La Côte, France (Université de Bourgogne)

	Année : 2000	Résultats
15	Nombre de pieds	120
	témoins non traités	13
	Nombre de traitements	14
	Type d'inoculum	Bactéries + Levures
20	Témoins	Mildiou puis <i>Botrytis</i> sur tous les pieds
	Protection	11 pieds malades (Mildiou), <i>O Botrytis</i>

25	Année : 2001	Résultats
	Nombre de pieds	614
	Nombre de traitements	13
	Traitements chimiques	02
	témoins non traités	13
30	Type d'inoculum	Bactéries + Levures
	Témoins	Mildiou + <i>Botrytis</i> sur tous les pieds
	Protection	53 pieds malades (Mildiou), quelques grappes infectées par <i>Botrytis</i>
35	Rendement	1,18 kg de raisin par pied au lieu de 1,2-1,5 kg

De manière générale, on note, en plus de l'effet fongicide et d'éliciteur des préparations utilisées, une amélioration de la qualité de la vendange. On constate notamment une augmentation de la concentration en sucre qui

permet de réduire ou d'éviter la chaptalisation. De plus, le taux de resvératrol est augmenté. Enfin, les taux de tanin et d'anthocyanes sont en augmentation, ce qui accorde une meilleure charpente et une couleur plus vive au vin.

5 Les résultats concernent l'augmentation de resvératrol sont illustrés par l'histogramme de la figure unique qui donne en ug/gm de poids frais la production de resvératrol au 3^{ème} jour après addition respectivement de : BP Y01 (levure déposée à la CNCM); BP B01 (bactérie déposée à la CNCM); BC 03
10 (botrytis cinerea); BP Y01 + B C03; BPB 01 + B C03; BP Y01 + BP B01; BP B01 + BP Y01 + B C03.

L'examen de cet histogramme montre que la formation de resvératrol augmente lorsqu'on ajoute le mélange levure/bactérie de l'invention au champignon *Botrytis*.

15 Compte tenu de l'ensemble de ces propriétés, les compositions utilisées comme préparations fongicides, selon l'invention, constituent une réponse particulièrement satisfaisante aux problèmes fongiques posés aux cultivateurs, notamment aux viticulteurs et à l'impératif de réduction des
20 pollutions d'origine agricole en constituant des substituts aux produits chimiques.

REVENDICATIONS

1.- Composition de microorganismes utilisable en lutte biologique contre les maladies cryptogamiques des végétaux, caractérisée en ce qu'elle comprend en mélange au moins une bactérie et au moins une levure, la ou les bactéries et la ou les levures étant non toxiques pour le végétal.

2.- Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la ou les bactéries sont choisies dans les genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*.

3.- Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que la ou les bactéries sont de l'espèce *Bacillus megaterium*.

4.- Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'il s'agit de la souche BP B01 déposée le 20 Juin 2002 à la CNCM sous le N°I-2896.

5.- Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la ou les levures sont du genre *Debaryomyces* ou *Pichia*.

6.- Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit de la levure BP Y01 déposée le 20 Juin 2002 à la CNCM sous le N°I-2897.

7.- Préparation biofungicide, caractérisée en ce qu'elle renferme une quantité efficace d'au moins une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, en association avec un véhicule inerte.

REVENDICATIONS

1.- Composition de microorganismes utilisable en lutte biologique contre les maladies cryptogamiques des végétaux,
5 caractérisée en ce qu'elle comprend en mélange au moins une bactérie et au moins une levure, la ou les bactéries et la ou les levures étant non toxiques pour le végétal.

2.- Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la ou les bactéries sont choisies dans les genres
10 *Bacillus, Pseudomonas, Serratia, Streptomyces*.

3.- Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que la ou les bactéries sont de l'espèce *Bacillus megaterium*.

4.- Composition selon la revendication 3, caractérisée en
15 ce qu'il s'agit de la souche BP B01 déposée le 20 Juin 2002 à la CNCM sous le N°I-2896.

5.- Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la ou les levures sont du genre *Debaryomyces ou Pichia*.

20 6.- Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit de la levure BP Y01 déposée le 20 Juin 2002 à la CNCM sous le N°I-2897.

7.- Préparation biofungicide, caractérisée en ce qu'elle renferme une quantité efficace d'au moins une composition
25 selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, en association avec un véhicule inerte.

8.- Préparation biofungicide selon la revendication 7, caractérisée par des concentrations en levures de 0,5 à $0,75 \times 10^{10}$ et en bactéries de 0,30 à $0,50 \times 10^{10}$.

9.- Application d'une préparation selon la revendication 5 7 ou 8, au traitement des maladies cryptogamiques des végétaux, notamment des plantes cultivées, par exemple vigne, tomate, fraise, blé, maïs, riz, pomme de terre, betterave, tabac, arbres fruitiers, canne à sucre.

10 10.- Application d'une préparation selon la revendication 9 au traitement de l'oïdium, du mildiou ou du *Botrytis* de la vigne, et d'*eutypa* et *esca*.

11.- Application selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce qu'elle comprend un traitement notamment par pulvérisation avec la ou les bactéries et la ou lesdites levures, selon la pression des pathogènes, notamment selon un rapport d'environ 50/50%.

12.- Application, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un traitement à l'aide d'une composition de champignons filamenteux, en particulier du genre *Pichia*, *Pythium*, 20 *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Talaromyces*, *Epicoccum*.

13.- Application de la composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 comme agent éliciteur pour la production de substances d'intérêt par le végétal traité, en 25 particulier de resvératrol.

8.- Préparation biofungicide selon la revendication 7, caractérisée par des concentrations en levures de 0,5 à $0,75 \times 10^{10}$ et en bactéries de 0,30 à $0,50 \times 10^{10}$.

9.- Application d'une préparation selon la revendication 7 ou 8, au traitement des maladies cryptogamiques des végétaux, notamment des plantes cultivées, par exemple vigne, tomate, fraise, blé, maïs, riz, pomme de terre, betterave, tabac, arbres fruitiers, canne à sucre.

10.- Application d'une préparation selon la revendication 10 9 au traitement de l'oïdium, du mildiou ou du *Botrytis* de la vigne, et d'*eutypa* et *esca*.

11.- Application selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce qu'elle comprend un traitement notamment par pulvérisation avec la ou les bactéries et la ou lesdites levures, selon la pression des pathogènes, notamment selon un rapport d'environ 50/50%.

12.- Application selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un traitement à l'aide d'une composition de champignons filamenteux, en particulier du genre *Pichia*, *Pythium*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Ampelomyces*, *Talaromyces*, *Epicoccum*.

13.- Application de la composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 comme agent éliciteur pour la 25 production de substances d'intérêt par le végétal traité, en particulier de resvératrol.

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITE DE BOURGOGNE

<120> Moyens de lutte biologique contre les maladies cryptogamiques des végétaux.

<130> 60711-1540

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 335

<212> DNA

<213> *Bacillus megaterium*

<400> 1

acgtttggac actttgttca gttttgagag agtaatctct caattataga aagcacacta 60

ctttcttc ttatataaaag aagaatattt gctgcgattt ttctttgaaa actagataac 120

agtcatgtt gaggaaaaagt gaaacttttc ttatcaaaa ccaataaaata acacaacagt 180

atgttgtacc atttattcgc taatggtaa gtttagaaagg ggcacgggt aatgccttgg 240

cactaggagc cgatgaagga cgggactaac accgatgtgc ttcggggagc tgtaagttag 300

ctttgatccg gagatttccg aatggggaaa cccgc 335

<210> 2

<211> 581

<212> DNA

<213> *Debaryomyces hansenii*

<400> 2

ggatcattac agtattcttt tgccagcgct taactgcgcg gcgaaaaacc ttacacacag 60

tgtcttttg atacagaact cttgcttgg tttggcttag agataggttggccagagg 120

ttaacaaaac acaatttaat tattttaca gttagtcaaa ttttgaatta atcttcaaaa 180

ctttcaacaa cggatctctt gtttcgcgc tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag 240

taatatgaat tgcagatttt cgtaatcat cgaatctttt aacgcacatt ggcgcctctg 300

gtattccaga gggcatgcct gtttgagcgt catttctctc tcaaaccccc gggtttggta 360

ttgagtgata ctcttagtcg gactaggcgt ttgcttgaaa agtattggca tggtagtac 420

tagatagtgc tgtcgacctc tcaatgtatt aggttatcc aactcggtga atgggtgtggc 480

gggatatttc tggtattgtt ggcccgccct tacaacaacc aaacaagttt gacctaataat 540

caggttaggaa tacccgctga acttaagcat atcaataagc g 581



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa
N° 11235*03



DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

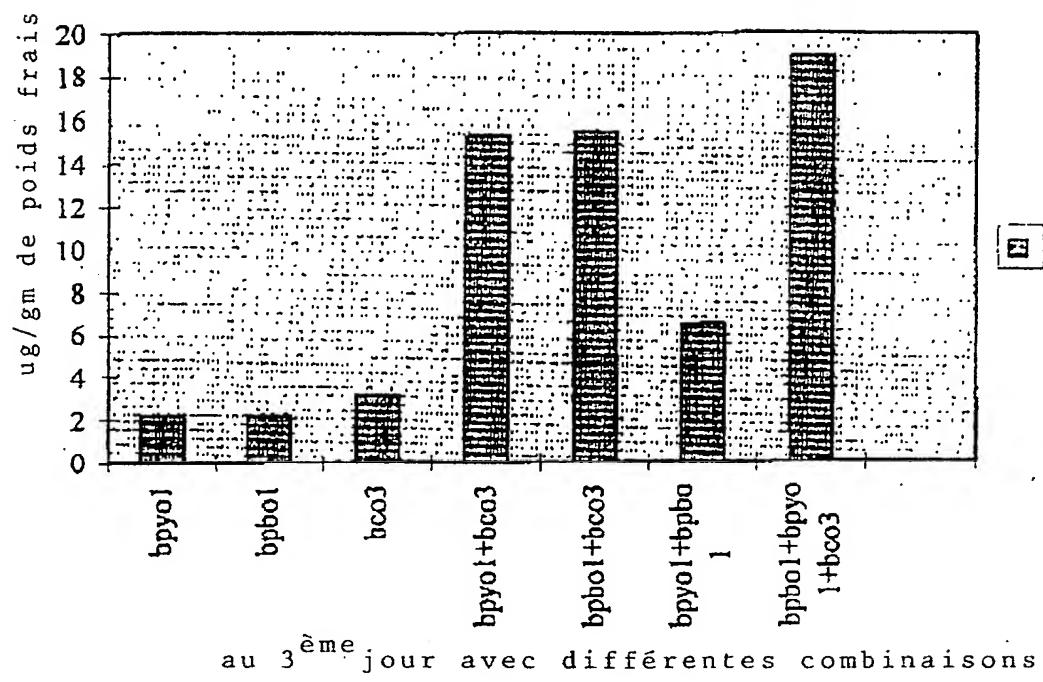
(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)	CP 60711
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	02 08 212
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)	
MOYENS DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES MALADIES CRYPTOGRAMIQUES DES VEGETAUX	
LE(S) DEMANDEUR(S) :	
Université de Bourgogne	
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :	
1 Nom PAUL Prénoms Bernard Adresse Rue 646, Rue de Moirey Code postal et ville 12 185 0 SAINT APOLLINAIRE Société d'appartenance (facultatif)	
2 Nom Prénoms Adresse Rue Code postal et ville 11111 Société d'appartenance (facultatif)	
3 Nom Prénoms Adresse Rue Code postal et ville 11111 Société d'appartenance (facultatif)	
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivie du nombre de pages.	
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)	
Mandataire : Chantal PEAUCELLE 92-1189 Le 10 juillet 2003	

FIGURE



FIGURE

